



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0051140

Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 07월 24일

Filing Date

JUL 24, 2003

출원인 : 한국과학기술원

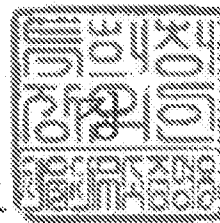
Applicant(s)

Korea Advanced Institute of Science and Technology

2010년 08월 20일

특 허 청

COMMISSIONER



◆ This certificate was issued by Korean Intellectual Property Office. Please confirm any falsity or alteration of the contents by an issue number or a barcode of the document below through the KIPDO's Online Issue of the Certificates' menu of Korean Intellectual Property Office homepage (www.kipo.go.kr). But please notice that the confirmation by the issue number is available only for 90 days.

접수	2005.10.27.
----	-------------

【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2005. 10. 27
【제출인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2003-015686-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0051140
【출원일자】	2003.07.24
【심사청구일자】	2003.07.24
【발명의 명칭】	고밀도 탄소나노튜브 패턴을 이용한 바이오센서의 제조방법
【제출원인】	
【발송번호】	9-5-2005-0446468-03
【발송일자】	2005.09.08

【보정할 서류】 명세서등

【보정할 사항】

【보정대상항목】 별지와 같음

【보정방법】 별지와 같음

【보정내용】 별지와 같음

【취지】 특허법시행규칙 제13조 · 실용신안법시행규칙 제8조의 규정에의하여 위
와 같이 제출합니다.

대리인

이처영 (인)

【수수료】

【보정료】 3,000원

【추가심사청구료】 0원

【기타 수수료】 0원

【합계】 3,000 원

【보정서】

【보정대상항목】 식별번호 24

【보정방법】 정정

【보정내용】

[0024] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 표면에 아미노기가 노출된 기질과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 상기 아미노기와 상기 카르복실기 간에 아미드 결합을 형성시켜 기질 표면에 CNT 단층을 형성하는 단계; (b) 상기 CNT 단층과 디아민계 유기화합물을 반응시켜 상기 CNT 단층위에 유기아민 층을 형성시키고, 상기 유기아민과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 CNT를 적층하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계를 n회 반복하여 CNT 층과 유기아민 층이 n회 교호되게 적층하여 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패턴을 형성하는 단계를 거쳐 제조되고, 기질 상에 고밀도로 고정된, 카르복실기가 노출된 탄소나노튜브(CNT)의 패턴에 상기 카르복실기와 결합하는 화학적 작용기를 가진 바이오 리셉터가 화학적 또는 물리화학적 결합에 의해 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 CNT-바이오센서를 제공한다.

【보정대상항목】 식별번호 25

【보정방법】 정정

【보정내용】

[0025] 본 발명은 또한, (a) 표면에 아미노기가 노출된 기질과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 상기 아미노기와 상기 카르복실기 간에 아미드 결합을 형성시켜 기

질 표면에 CNT 단층을 형성하는 단계; (b) 상기 CNT 단층과 디아민계 유기화합물을 반응시켜 상기 CNT 단층위에 유기아민 층을 형성시키고, 상기 유기아민과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 CNT를 적층하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계를 n회 반복하여 CNT 층과 유기아민 층이 n회 교호되게 적층하여 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패턴을 형성하는 단계를 거쳐 제조되고, 기질 상에 고정된, 카르복실기가 노출된 CNT의 패턴을 상기 카르복실기와 결합하는 작용기와 아미노기, 알데히드기, 수산기, 티올기 및 할로겐으로 구성된 군에서 선택된 화학적 작용기를 동시에 가지는 화합물로 개질한 다음, 상기 개질에 의해 노출된 아미노기, 알데히드기, 수산기, 티올기 및 할로겐으로 구성된 군에서 선택된 화학적 작용기에, 상기 화학적 작용기와 결합하는 작용기를 가진 바이오 리셉터를 화학적 또는 물리화학적으로 결합시켜 수득되는 것을 특징으로 하는 CNT-바이오센서를 제공한다.

【보정대상항목】 식별번호 26

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 청구항 1

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 1】

다음의 단계를 거쳐 제조되고, 기질 상에 고밀도로 고정된, 카르복실기가 노출된 탄소나노튜브(CNT)의 패턴에 상기 카르복실기와 결합하는 화학적 작용기를 가

진 바이오 리셉터가 화학적 또는 물리화학적 결합에 의해 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 CNT-바이오센서:

(a) 표면에 아미노기가 노출된 기질과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 상기 아미노기와 상기 카르복실기 간에 아마이드 결합을 형성시켜 기질 표면에 CNT 단층을 형성하는 단계;

(b) 상기 CNT 단층과 디아민계 유기화합물을 반응시켜 상기 CNT 단층위에 유기아민 층을 형성시키고, 상기 유기아민과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 CNT를 적층하는 단계; 및

(c) 상기 (b)단계를 n회 반복하여 CNT 층과 유기아민 층이 n회 교호되게 적층하여 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패턴을 형성하는 단계.

【보정대상항목】 청구항 2

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 2】

다음의 단계를 거쳐 제조되고, 기질 상에 고밀도로 고정된, 카르복실기가 노출된 탄소나노튜브(CNT)의 패턴을 상기 카르복실기와 결합하는 작용기와 아미노기, 알데히드기, 수산기, 티올기 및 할로겐으로 구성된 군에서 선택된 화학적 작용기를 동시에 가지는 화학물질로 개질한 다음, 상기 개질에 의해 노출된 아미노기, 알데히드기, 수산기, 티올기 및 할로겐으로 구성된 군에서 선택된 화학적 작용기에, 상

기 화학적 작용기와 결합하는 작용기를 가진 바이오 리셉터를 화학적 또는 물리화학적으로 결합시켜 수득되는 것을 특징으로 하는 CNT-바이오센서:

(a) 표면에 아미노기가 노출된 기질과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 상기 아미노기와 상기 카르복실기 간에 아마이드 결합을 형성시켜 기질 표면에 CNT 단층을 형성하는 단계;

(b) 상기 CNT 단층과 디아민계 유기화합물을 반응시켜 상기 CNT 단층위에 유기아민 층을 형성시키고, 상기 유기아민과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 CNT를 적층하는 단계; 및

(c) 상기 (b)단계를 n회 반복하여 CNT 층과 유기아민 층이 n회 교호되게 적층하여 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패튼을 형성하는 단계.

【보정대상항목】 청구항 6

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 청구항 7

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 7】

제1항 또는 제2항에 있어서, 표면에 아미노 작용기가 노출된 기질은 기질을 아미노알킬옥시실란으로 처리하여 얻어진 것임을 특징으로 하는 CNT-바이오센서.

【보정대상항목】 청구항 8

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 8】

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 기질 표면에 노출된 아미노기는 원하는 위치에 CNT를 결합시키기 위하여 패턴형태로 노출되어 있는 것을 특징으로 하는 CNT-바이오센서.

접수	2004.02.17.
----	-------------

【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.02.17
【제출인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2003-015686-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0051140
【출원일자】	2003.07.24
【심사청구일자】	2003.07.24
【발명의 명칭】	고밀도 탄소나노튜브 패턴을 이용한 바이오센서의 제조방법
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-2003-0272039-22
【접수일자】	2003.07.24

【보정할 서류】 명세서등

【보정할 사항】

【보정대상항목】 별지와 같음

【보정방법】 별지와 같음

【보정내용】 별지와 같음

【취지】 특허법시행규칙 제13조 · 실용신안법시행규칙 제8조의 규정에 의하여 위
와 같 이 제출합니다.

대리인

이처영 (인)

【수수료】

【보정료】 0 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 0 원

【보정서】

【보정대상항목】 식별번호 57

【보정방법】 정정

【보정내용】

[0057] 본 발명에 있어서, 디아민계 유기화합물로는 $H_2N-R_1-NH_2$ 의 화학식을 가지는 물질을 사용할 수 있다. 여기서, R_1 은 C_{1-20} 인 포화탄화수소류, 불포화탄화수소류 또는 방향족 유기기이다.

【보정대상항목】 식별번호 59

【보정방법】 정정

【보정내용】

[0059] 상기 카르복실기가 노출된 CNT 패턴은 상기 카르복실기와 반응하는 화학적 작용기(아미노기, 수산기 등)와 목적 바이오 리셉터가 가지고 있는 작용기와 결합하는 화학적 작용기(아미노기, 수산기, 티올기, 알데히드기 등)를 동시에 가지는 화학물질을 사용하여 개질할 수 있다. 상기 개질에 사용할 수 있는 화학물질로는 $H_2N-R_1-NH_2$, H_2N-R_2-SH , H_2N-R_3-OH , H_2N-R_4-CHO 등을 사용할 수 있다. 여기서, R_1 , R_2 , R_3 및 R_4 는 독립적으로 C_{1-20} 인 포화탄화수소류, 불포화탄화수소류 또는 방향족 유기기이다.

【서지사항】

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003. 12.30
【제출인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2003-015686-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0051140
【출원일자】	2003.07.24
【심사청구일자】	2003.07.24
【발명의 명칭】	고밀도 탄소나노튜브 패턴을 이용한 바이오센서의 제조방법
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-2003-0272039-22
【접수일자】	2003.07.24
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	

【보정대상항목】 발명자

【보정방법】 정정

【보정내용】

【발명자】

【성명의 국문표기】 정희태

【성명의 영문표기】 JUNG, HEE TAE

【주민등록번호】 641005-1XXXXXX

【우편번호】 305-340

【주소】 대전광역시 유성구 도룡동 383-2 과기원 교수아파트 3-403

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이상엽

【성명의 영문표기】 LEE, SANG YUP

【주민등록번호】 640412-1XXXXXX

【우편번호】 305-761

【주소】 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 212-702

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 정대환

【성명의 영문표기】 JUNG, DAE HWAN

【주민등록번호】 710901-1XXXXXX

【우편번호】 305-330

【주소】 대전광역시 유성구 지족동 919 열매마을아파트 701-902

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김병훈

【성명의 영문표기】 KIM,BYUNG HUN

【주민등록번호】 771216-1XXXXXX

【우편번호】 156-772

【주소】 서울특별시 동작구 사당2동 극동아파트 101-1105

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 고영관

【성명의 영문표기】 KO,YOUNG KOAN

【주민등록번호】 730223-1XXXXXX

【우편번호】 305-755

【주소】 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 125-401

【국적】 KR

【취지】 특허법시행규칙 제13조 · 실용신안법시행규칙 제8조의 규정에의하여 위
와 같 이 제출합니다.

대리인

이처영 (인)

【수수료】

【보정료】 0 원

【기타 수수료】 원

【합계】

0 원

【첨부서류】

*.기타첨부서류[발명자 주소변경]*통

【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2003.07.24

【발명의 국문명칭】 고밀도 탄소나노튜브 패턴을 이용한 바이오센서의 제조방법

【발명의 영문명칭】 Method for Manufacturing a Biosensor Using the High Density Carbon Nanotube Pattern

【출원인】

【명칭】 한국과학기술원

【출원인코드】 3-1998-098866-1

【대리인】

【성명】 이처영

【대리인코드】 9-2003-000118-9

【포괄위임등록번호】 2003-015686-1

【발명자】

【성명의 국문표기】 정희태

【성명의 영문표기】 JUNG, HEE TAE

【주민등록번호】 641005-1XXXXXX

【우편번호】 305-340

【주소】 대전광역시 유성구 도룡동 ***-* 과기원 교수아파트 *동
***호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이상엽

【성명의 영문표기】 LEE, SANG YUP

【주민등록번호】 640412-1XXXXXX

【우편번호】 305-330

【주소】 대전광역시 유성구 지족동 *** 열매마을아파트 ***동 ***호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 정대환

【성명의 영문표기】 JUNG, DAE HWAN

【주민등록번호】 710901-1XXXXXX

【우편번호】 305-330

【주소】 대전광역시 유성구 지족동 *** 열매마을아파트 ***동 ***호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김병훈

【성명의 영문표기】 KIM, BYUNG HUN

【주민등록번호】 771216-1XXXXXX

【우편번호】 156-772

【주소】 서울특별시 동작구 사당*동 극동아파트 ***동 ****호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 고영관

【성명의 영문표기】 KO, YOUNG KOAN

【주민등록번호】 730223-1XXXXXX

【우편번호】 305-755

【주소】 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 ***동 ***호

【국적】 KR

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 2

【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다.

대리인

이처영 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 13 면 13,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 19 항 717,000 원

【합계】 759,000 원

【감면사유】	정부출연연구기관
【감면후 수수료】	379,500 원
【첨부서류】	*.요약서·명세서(도면)_*통

【요약서】

【요약】

본 발명은 카르복실기가 노출된 고밀도의 탄소나노튜브(CNT) 패턴에 표적 바이오물질과 결합하는 바이오 리셉터가 화학적 또는 물리화학적으로 결합되어 있는 CNT-바이오센서 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 카르복실기가 노출된 CNT 패턴 또는 상기 카르복실기를 다양한 화학적 작용기로 개질한 CNT 패턴에 다양한 바이오 리셉터를 화학적 또는 물리화학적으로 결합시킨 CNT-바이오센서의 제작이 가능하다.

【대표도】

도 1

【색인어】

탄소나노튜브(CNT), 바이오 리셉터, 바이오센서, 카르복실기, 개질

【명세서】

【발명의 명칭】

고밀도 탄소나노튜브 패턴을 이용한 바이오센서의 제조방법 {Method for Manufacturing a Biosensor Using the High Density Carbon Nanotube Pattern}

【도면의 간단한 설명】

[0001] 도 1은 카르복실기가 노출된 CNT 패턴에 아미노기를 가진 DNA를 결합시켜 제작된 CNT-DNA 칩에 상보적인 DNA가 결합하는 것을 나타낸 것이다.

[0002] 도 2는 카르복실기가 노출된 CNT 패턴을 아미노기로 개질한 다음, 카르복실 말단기를 가진 DNA를 결합시켜 제작된 CNT-DNA 칩에 상보적인 DNA가 결합하는 것을 나타낸 것이다.

[0003] 도 3은 DNA가 화학적으로 결합된 CNT 패턴 표면의 인에 대한 XPS 스펙트럼이다.

[0004] 도 4(a)는 DNA를 결합시키기 전의 카르복실기가 노출된 CNT가 고밀도로 고정된 기질(substrate) 모습을, (b)는 상기 CNT 패턴 상에 아미노기 말단기를 가진 DNA를 결합시킨 후 상보적인 DNA를 혼성화 반응 시킨 경우의 형광 검출결과를, (c)는 상보적이지 않은 DNA를 혼성화 반응 시킨 경우의 형광 검출결과를 나타낸 것이다.

[0005] 도 5(a)는 아미노기로 개질한 상기 CNT 패턴 상에 카르복실 말단기를 가진

DNA를 결합시킨 후 상보적인 DNA를 혼성화 반응 시킨 경우의 형광 검출결과를, (b)는 상보적이지 않은 DNA를 혼성화 반응 시킨 경우의 형광 검출결과를 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

[0006] 본 발명은 카르복실기가 노출된 고밀도의 탄소나노튜브(carbon nanotube: CNT) 패턴에 표적 바이오물질과 결합하는 바이오 리셉터가 화학적 또는 물리화학적 으로 결합되어 있는 바이오센서 및 그 제조방법에 관한 것이다.

[0007] CNT란 지구상에 다량으로 존재하는 탄소로 이루어진 탄소 동소체로서 하나의 탄소가 다른 탄소원자와 육각형 벌집무늬로 결합되어 튜브형태를 이루고 있는 물질이며, 튜브의 직경이 나노미터($\text{nm}=10\text{억분의 } 1\text{미터}$) 수준으로 극히 작은 영역의 물질이다. CNT는 우수한 기계적 특성, 전기적 선택성, 뛰어난 전계방출 특성, 고효율의 수소저장매체 특성 등을 지니며 현존하는 물질 중 결합이 거의 없는 완벽한 신소재로 알려져 있다.

[0008] CNT는 역학적 견고성과 화학적 안정성이 뛰어나고, 반도체와 도체의 성질을 모두 띌 수 있으며, 직경이 작고 길이가 상대적으로 매우 긴 특성 때문에, 평판표시소자, 트랜지스터, 에너지 저장체 등의 소재로서 뛰어난 성질을 보이고, 나노크기의 각종 전자소자로서의 응용성이 매우 크다.

[0009]

상기 표현한 특성들을 보다 다양하게 응용하기 위해 단일벽 CNT를 강산을 사용하여 잘게 자르기 시작했다. 이렇게 잘라진 CNT들은 잘려진 말단(ends) 및 옆면(sidewall)의 일부에 주로 -COOH 화학적 작용기를 가지게 된다. 이러한 화학적 작용기를 이용하여 다양한 물질들을 화학적으로 붙이기 시작하여 CNT의 성질을 개질하기도 하였다. 더 나아가 화학적 기작에 의해 CNT의 작용기를 -SH 기로 치환한 후, 금 표면에 미세접촉 인쇄(micro contact printing) 기법을 이용하여 표면에 패턴화한 보고(Nan, X. *et al.*, J. Colloid Interface Sci., 245: 311-8, 2002)와 정전기적 방법(electrostatic method)을 이용하여 CNT를 표면에 다중막으로 고착시킨 보고가 있다(Rouse, J.H. *et al.*, Nano Lett., 3:59-62, 2003). 그러나 전자는 CNT의 표면 밀도가 낮고 결합력이 약하다는 단점이 있으며, 후자는 선택적으로 표면에 고정하는 패터닝 방법을 적용할 수 없다는 치명적인 단점을 가지고 있다. 따라서 새로운 형태의 표면 고정법 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0010]

현재 10만 여개로 예측되는 인간 유전자 중, 1만여 개의 기능이 밝혀져 있고, 이러한 유전자들은 대부분이 질환과 직접적인 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 대부분의 질병이 유전자 수준이 아닌 단백질 수준에서 유발되기 때문에, 현재까지 개발되었거나 개발 중에 있는 의약품의 95% 이상이 단백질을 타겟으로 하고 있다. 따라서, 특정 단백질 및 리간드에 상호작용 하는 생체분자의 기능을 밝히고, 단백질 기능분석 및 네트워크 분석을 통하여 얻어진 자료를 바탕으로, 고전적인 방법으로는 불가능하였던, 질병에 대한 치료 및 예방법을 개발하는 연구에 필수적인 것이 효율적인 단백질-단백질 및 단백질-리간드 간의 반응 검출기술이다.

[0011] 최근, CNT의 전기적, 반도체 성질 또는 구조적으로 안정한 특성을 이용하여, 바이오물질을 고정화한 CNT의 전기화화학적 변화를 통한 반응검출에 대한 연구가 이루어지고 있다 (Dai, H. *et al.*, *ACC. Chem. Res.*, 35:1035-44, 2002; Sotiropoulou, S. *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 375:103-5, 2003; Erlanger, B.F. *et al.*, *Nano Lett.*, 1:465-7, 2001; Azamian, B.R. *et al.*, *JACS*, 124:12664-5, 2002).

[0012] 한편, 단백질-리간드 반응으로써 대표적인 예로, 아비딘(avidin)-바이오틴(biotin) 반응을 들 수 있는데, 고분자로 처리된 기질위에 CNT를 이용하여 채널을 형성한 다음, 전기화화학적 방법을 통하여 스트렙토아비딘의 결합을 측정하였다 (Star, A. *et al.*, *Nano Lett.*, 3:459-63, 2003).

[0013] 바이오센서로서 CNT가 주목받는 이유는 첫째, 레이블링이 필요 없고 둘째, 신호의 변화에 매우 민감하며 셋째, 단백질의 변형 없이 수용액 상에서 반응을 진행시킬 수 있기 때문이다. 새로운 나노물질과 생물학적 시스템의 결합은 질병진단(유전병), 프로테오믹스, 나노바이오기술 분야에서 중요한 응용기술들을 창출해 나갈 것이다.

[0014] 보다 빠르고 값이 싼 바이오센서를 개발하기 위해, 최근 DNA 혼성화 감지 기술에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. DNA의 혼성화를 감지하기 위한 다양한 레이블링 기술들이 개발되었는데, 현재 레이블링에 가장 일반적으로 형광물질이 사용되고 있다. 상보적인 DNA를 감지할 수 있는 단일 DNA 사슬을 고정하여 수용액 상에 있는 상보적인 DNA를 인식하고, 신호 변환기가 DNA 혼성화 신호를 분석할 수 있는

신호로 바꾸어준다.

[0015] DNA 칩으로 DNA 혼성화를 효율적으로 검출하기 위해서는 혼성화 효율을 높이며 동시에 비특이적 결합에 의한 배경(background)을 없앨 수 있는 효과적인 표면 처리가 필요하다. 이러한 표면처리된 DNA 칩 플랫폼(platform)을 만들기 위해 많은 연구가 진행되어 왔다(Anal. Biochem., 266:23-30, 1999; Nuc. Acid. Res., 29(21):107, 2001).

[0016] 또한, DNA 혼성화 (hybridization) 검출에 다양한 방법들이 모색되었는데, 스캐노메트릭 (Scanometric) 방법, 칼로리메트릭(Colorimetric) 방법, 나노입자 (nanoparticle)를 이용한 방법, 전기화학을 이용한 방법(Science, 289:1757-60, 2000; Anal. Biochem., 295:1-8, 2001; Analyst., 127:803-8, 2002; Anal. Bioanal. Chem., 375:287-93, 2003) 등이 있다.

[0017] 한편, CNT를 생명공학분야에서 응용하는 사례가 최근에 많이 등장하고 있다. 글루코스 센서, 단백질의 검출, 특정 DNA 서열의 검출 (Anal. Bioanal. Chem., 375:103-5, 2003; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(9):4984-9, 2003; Anal. Bioanal. Chem., 375:287-93, 2003) 등이 그것이다. CNT를 기반으로 한 다층(multilayer)에서의 생물분자 검색은 표면적이 넓고 전기전도도 성질이 우수하여 DNA와 같은 생물분자가 고정되는 양을 늘릴 수 있고, 생물분자에 대한 검출 민감도를 증대시킬 수 있다.

[0018] 현재로서는 바이오칩에서 반응결과를 검출하는 방법은 기존의 형광물질과 동위원소 등을 이용하는 방법이 가장 보편적이나(Toriba, A. *et al.*, Biomed.

Chromatography:BMC., 17:126-32, 2003; Raj, S.U. *et al.*, Anal. Chim.Acta, 484:1-14, 2003; Peggy, A.T. *et al.*, J. Microbio. Meth., 53:221-33, 2003), 좀 더 손쉽게 정확하게 전기적 성질을 측정할 수 있는 새로운 방법들이 시도되면서 CNT라는 신소재의 필요성이 더욱 높아지고 있다.

[0019] 고밀도의 CNT 멀티레이어(multilayer)를 만들어 그 위에 DNA를 부착한 다음, 상보적으로 결합하는 DNA를 검출하는 방법은 게놈분석(genotyping), 돌연변이 검색(mutation detection), 병원성 균 진단(pathogen identification) 등에 유용하다. PNA(peptide nucleic acid: DNA 유사체)를 단일벽(single walled) CNT에 위치 특이적으로 고정하고, 목적 DNA와 상보적으로 결합하는 것을 검출한 보고가 있다(Williams, K.A. *et al.*, Nature, 420:761, 2001). 또한, 전기화학적인 방법을 통해 올리고뉴클레오티드를 CNT 어레이에 고정하고, 구아니딘 산화(guanidine oxidation) 방법을 통해 DNA를 검출한 예도 있다(Li, J. *et al.*, Nano Lett., 3:597-602, 2003). 그러나 이것들은 CNT를 바이오센서의 제작 및 개발에 적용한 것은 아니다.

[0020] 최근, CNT를 이용한 고용량의 바이오분자 검출센서(WO 03/016901 A1)가 알려져 있다. 기질 위에 화학적 연결체를 사용하여 복수의 CNT를 배열하고 여러 종류의 리셉터를 부착하여 얻어지는 멀티채널형 바이오칩에 관한 것으로, 비교적 주변 환경변화에 약한 단점을 가지고 있다.

[0021] 이에, 본 발명자들은 원하는 부위에 화학적 결합을 통하여 CNT를 적층시켜 카르복실기가 노출된 고밀도의 CNT 패턴을 형성한 다음, 상기 CNT 패턴에 바이오

리셉터를 화학적으로 결합시킨 CNT-바이오센서를 제조하는 방법을 착안하여 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

[0022] 본 발명의 목적은 원하는 위치에 화학적 결합에 의해 적층된 고밀도의 CNT 패턴에 바이오 리셉터가 부착되어 있는 CNT-바이오센서 및 그 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0023] 본 발명의 다른 목적은 상기 CNT-바이오센서를 이용하여 다양한 종류의 바이오 리셉터에 결합하거나 반응하는 다양한 표적 바이오물질을 검출하는 방법을 제공하는 데 있다.

【발명의 구성】

[0024] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 기질 상에 고정된, 카르복실기가 노출된 CNT의 패턴에 상기 카르복실기와 결합하는 화학적 작용기를 가진 바이오 리셉터가 화학적 또는 물리화학적 결합에 의해 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 CNT-바이오센서를 제공한다.

[0025] 본 발명은 또한, 기질 상에 고정된, 카르복실기가 노출된 CNT의 패턴을 상기 카르복실기와 결합하는 작용기와 아미노기, 알데히드기, 수산기, 티올기 및 할로겐으로 구성된 군에서 선택된 화학적 작용기를 동시에 가지는 화학물질로 개질한 다

음, 상기 개질에 의해 노출된 아미노기, 알데히드기, 수산기, 티올기 및 할로젠으로 구성된 군에서 선택된 화학적 작용기에, 상기 화학적 작용기와 결합하는 작용기를 가진 바이오 리셉터를 화학적 또는 물리화학적으로 결합시켜 수득되는 것을 특징으로 하는 CNT-바이오센서를 제공한다.

[0026] 본 발명에서 상기 CNT 패턴은 (a) 표면에 아미노기가 노출된 기질과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 상기 아미노기와 상기 카르복실기 간에 아미드 결합을 형성시켜 기질 표면에 CNT 단층을 형성하는 단계; (b) 상기 CNT 단층과 디아민계 유기화합물을 반응시켜 상기 CNT 단층 위에 유기아민 층을 형성시키고, 상기 유기아민과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 CNT를 적층하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계를 n회 반복하여 CNT 층과 유기아민 층이 n회 교호되게 적층하여 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패턴을 형성하는 단계를 거쳐 제조할 수 있다.

[0027] 본 발명은 또한, (a) 표면에 아미노기가 노출된 기질과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 상기 아미노기와 상기 카르복실기 간에 아미드 결합을 형성시켜 기질 표면에 CNT 단층을 형성하는 단계; (b) 상기 CNT 단층과 디아민계 유기화합물을 반응시켜 상기 CNT 단층위에 유기아민 층을 형성시키고, 상기 유기아민과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 CNT를 적층하는 단계; (c) 상기 (b)단계를 n회 반복하여 CNT 층과 유기아민 층이 n회 교호되게 적층하여 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패턴을 형성하는 단계; 및 (d) 상기 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패턴에 상기 카르복실기와 결합하는 화학적 작용기를 가진 바이오 리셉터를 화학적 또는

물리화학적으로 결합시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 CNT 패턴에 바이오 리셉터가 결합되어 있는 CNT-바이오센서의 제조방법을 제공한다.

[0028]

본 발명은 또한, (a) 표면에 아미노기가 노출된 기질과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 상기 아미노기와 상기 카르복실기 간에 아마이드 결합을 형성시켜 기질 표면에 CNT 단층을 형성하는 단계; (b) 상기 CNT 단층과 디아민계 유기화합물을 반응시켜 상기 CNT 단층위에 유기아민 층을 형성시키고, 상기 유기아민과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 CNT를 적층하는 단계; (c) 상기 (b)단계를 n회 반복하여 CNT 층과 유기아민 층이 n회 교호되게 적층하여 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패턴을 형성하는 단계; (d) 상기 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패턴을 상기 카르복실기와 결합하는 작용기와 아미노기, 알데히드기, 수산기, 티올기 및 할로겐으로 구성된 군에서 선택된 화학적 작용기를 동시에 가지는 화학물질로 개질하는 단계; 및 (e) 상기 개질에 의해 노출된 아미노기, 알데히드기, 수산기, 티올기 및 할로겐으로 구성된 군에서 선택된 화학적 작용기에 상기 화학적 작용기와 결합하는 작용기를 가진 바이오 리셉터를 화학적 또는 물리화학적으로 결합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 CNT 패턴에 바이오 리셉터가 결합되어 있는 CNT-바이오센서의 제조방법을 제공한다.

[0029]

본 발명에 있어서, 표면에 아미노 작용기가 노출된 기질은 기질을 아미노알킬옥시실란으로 처리하여 얻을 수 있으며, 상기 기질 표면에 노출된 아미노기는 원

하는 위치에 CNT를 결합시키기 위하여 패턴형태로 노출되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 아미노기가 패턴형태로 노출된 기질은 아미노기가 노출된 기질에 포토레지스트 또는 유기초분자 패턴을 형성하여 얻을 수 있다. 이러한 패턴에 CNT는 수직 또는 수평 방향으로 적층 또는 고정할 수 있으며, 유기초분자의 나노패턴인 경우에는 CNT를 수직방향으로 고정하는 것이 바람직하다.

[0031] 상기 아미노기가 패턴형태로 노출된 기질은 반도체 공정에서 관용적으로 사용되는 포토리쓰그래피 방법을 이용하여 아미노기가 노출된 기질에 포토레지스트 패턴을 형성하여 수득하거나, 기질 상에 포토레지스트 또는 유기초분자 패턴을 형성한 다음, 아미노알킬옥시실란으로 처리하여 수득할 수도 있다.

[0032] 본 발명은 또한, 상기 CNT-바이오센서를 이용하는 것을 특징으로 하는 바이오 리셉터와 결합하거나 반응하는 표적 바이오물질의 검출방법을 제공한다.

[0033] 본 발명은 또한, 바이오 리셉터가 DNA인 것을 특징으로 하는 CNT-DNA 칩 및 상기 CNT-DNA칩을 이용하는 것을 특징으로 하는 DNA 혼성화 반응의 검출방법을 제공한다.

[0034] 본 발명에 있어서, 카르복실기와 결합하는 화학적 작용기는 아미노기 또는 수산기인 것이 바람직하다.

[0035] 본 발명에 있어서, 바이오 리셉터는 카르복실기, 아미노기, 수산기, 알데히드기, 또는 티올기를 가지는 효소기질, 리간드, 아미노산, 펩티드, 단백질, 핵산(DNA, RNA), 지질, 코펙터 또는 탄수화물인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, 표적 바이오물질은 바이오 리셉터와 반응하거나 결합하여 검출되는 표적 역할을 할 수 있는 물질로서, 바람직하게는 단백질, 핵산, 항체, 효소, 탄수화물, 지질 또는 기타 생체유래의 생물분자이며, 더욱 바람직하게는 핵산(DNA, RNA) 또는 단백질이다.

[0037] 본 발명에서 사용되는 'CNT-바이오센서' 용어는 CNT 패턴에 바이오 리셉터가 화학적 또는 물리화학적으로 결합되어 있는 것을 포괄하는 개념으로, 고밀도 CNT 패턴에 바이오 리셉터가 화학적 또는 물리화학적 결합(특히, 아미드 결합)에 부착되어 있는 바이오칩을 포함하는 것으로 정의된다.

[0038] 본 발명에 있어서, 기질은 실리콘, 유리, 용융실리카, 플라스틱 및 PDMS로 구성된 군에서 선택된 재질인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0039] 본 발명에서는 CNT를 화학적 작용기(아미노기)가 코팅된 고체 기질 위에 화학적 결합을 통하여 반복적으로 적층하여 높은 표면 밀도를 갖는 카르복실기가 노출된 CNT 패턴을 제작한 다음, 상기 카르복실기와 화학적으로 반응하는 작용기(아미노기, 수산기 등)를 가진 바이오 리셉터를 부착하여 다양한 종류의 표적 바이오

물질을 직접 검출하거나, 전기화학적 신호를 이용하여 검출할 수 있는 CNT-바이오 센서를 제작하였다.

[0040] 본 발명에 의하면, CNT를 일정한 위치에 놓여진 촉매로부터 성장시켜서 완성했던 종래 기술의 한계에서 벗어나, 원하는 위치에 원하는 모양의 패턴을 형성할 수 있다. 본 발명은 화학적인 방법의 장점을 최대한 이용할 수 있도록 고분자나 유기분자를 이용하여 기판의 패턴을 형성하여 상기 종래 기술의 단점을 개선하였다.

[0041] 본 발명에 있어서, 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패턴에 상기 카르복실기와 반응하는 아미노기 또는 수산기를 가진 바이오 리셉터를 화학적 또는 물리화학적으로 결합하여 바이오 센서를 제작한다.

[0042] 또한, 아미노기가 노출된 고밀도 CNT 패턴에 상기 아미노기와 반응하는 카르복실기 또는 알데히드기를 가진 바이오 리셉터를 화학적 또는 물리화학적으로 결합하여 바이오 센서를 제작한다.

[0043] 한편, 상기 카르복실기 또는 아미노기와 결합하는 작용기를 가지지 않는 바이오 리셉터를 부착시키기 위해서는, 상기 카르복실기가 노출된 CNT 패턴을 상기 카르복실기와 결합하는 화학적 작용기와 목적 바이오 리셉터가 가지고 있는 작용기와 결합하는 화학적 작용기를 동시에 가지는 화학물질을 사용하여 개질할 수 있다. 따라서, 거의 모든 바이오 리셉터를 상기 고밀도 CNT 패턴에 화학적 또는 물리화학

적으로 결합시킬 수 있다.

[0044] 예컨대, 티올기를 가지는 바이오 리셉터를 부착하기 위해서는 카르복실기와 결합하는 화학적 작용기와 티올 작용기를 동시에 가지는 화학물질을 사용하여 개질하여 티올 작용기를 CNT 패턴의 표면에 노출시킨 다음, S-S 결합을 통해 상기 티올기를 가지는 바이오 리셉터를 부착할 수 있다.

[0045] 본 발명에 있어서, CNT는 각각 전하가 인가될 수 있도록 적어도 하나의 전도성 나노와이어(nanowires)를 통해 전원에 연결될 수 있으며, 여기서 전도성 나노와이어는 종래기술을 이용하여 단일원자로 형성할 수 있으며(Science, 275:1896-97, 1997), 전도성 금속으로 일정한 패턴을 형성한 후 이온 주입(implantation)이나 스퍼터링(sputtering)을 이용하여 전류가 흐를 수 있는 도선을 증착시킬 수 있다.

[0046] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0047] 실시예 1: 카르복실기가 노출된 CNT의 제조

[0048] 본 발명에서 사용되는 CNT는 특별히 제한되지 않으며, 시판되는 제품을 구입

하여 사용하거나, 통상의 방법에 의해 제조하여 사용할 수도 있다. 순수한 CNT를 본 발명에 사용하기 위해서는 CNT의 표면 및/또는 양 말단을 카르복실화시켜야 한다.

[0049] 카르복실기가 노출된 CNT는 강산(질산과 황산의 혼합용액) 용액이 담긴 소니케이터에서 24시간 동안 환류시킨 다음, 0.2 μ m 필터로 여과한 후, 그 여과물을 진산에 담가 90℃에서 45시간 동안 환류시킨 다음 원심분리하였다. 상층액을 회수하여 0.1 μ m 필터로 여과한 다음 건조시켰다. 건조된 카르복실기가 노출된 CNT를 증류수 또는 유기용매에 분산시킨 다음, 0.1 μ m 필터로 여과하여 일정한 크기를 갖는 CNT를 선별하였다.

[0050] 실시예 2: 아미노기가 패턴형태로 노출된 기질 제작

[0051] 본 발명에 있어서, 기질 상에 패턴형태의 아미노기를 노출시키기 위하여 2가지 방법을 사용할 수 있다. 첫째는 실리콘, 유리, 용융실리카, 플라스틱, PDMS (polydimethylsiloxane) 등의 기질 상에 고분자, 포토레지스트 또는 유기초분자 패턴을 형성한 다음, 상기 패턴을 마스크로 하여 아미노알킬옥시실란을 표면에 고정하여 아미노기를 기질표면에 패턴형태로 노출시키는 방법이다. 둘째는 기질 표면을 아미노알킬옥시실란으로 처리한 다음, 고분자, 포토레지스트 또는 유기초분자 패턴을 형성하여 아미노기를 기질표면에 패턴형태로 노출시키는 방법이다. 상기 아미노알킬옥시실란으로는 아미노프로필트리에톡시실란을 사용하는 것이 바람직하다.

[0052] 상기 고분자 또는 포토레지스트 패턴은 반도체 공정에서 관용적으로 사용되는 포토리소그래피 방법을 사용하여 용이하게 형성할 수 있고, 유기초분자의 패턴은 본 발명자들이 출원한 한국특허출원 10-2003-0032514호 및 10-2003-0037752호의 방법에 의해 형성할 수 있다.

[0053] **실시예 3: 고밀도 CNT 패턴의 형성**

[0054] 실시예 1에서 준비한 카르복실기가 노출된 CNT를 실시예 2에서 준비한 아미노기가 패턴형태로 노출된 기질과 반응시켜 상기 카르복실기와 상기 아미노기 간에 아마이드 결합을 통하여 기질 상에 CNT 단층을 형성한다.

[0055] 본 발명에서는 상기 아마이드 결합을 촉진하기 위하여, 커플링제로써 DCC(1,3-dicyclohexyl carbodiimide), HATU(*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl uronium hexafluorophosphate), HBTU (*O*-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate), HAPyU (*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-bis(tetramethylene)uronium hexafluorophosphate), HAMDU(*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,3-dimethyl-1,3-dimethylenuronium hexafluorophosphate), HBMDU(*O*-(benzotriazol-1-yl)-1,3-dimethyl-1,3-dimethylenuronium hexafluorophosphate) 등을, 베이스(base)로써 DIEA(diisopropylethylamine), TMP(2,4,6-trimethylpyridine), NMI(*N*-methylimidazole) 등을 사용하는 것이 바람직하다. 또한 물을 용매로 사용할 때 커

플링제로서 EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylamini-propyl) carbodiimide hydrochloride)를 사용하고, 커플링제의 보조제로서 NHS (*N*-hydroxysuccinimide), NHSS(*N*-hydroxysulfosuccinimide) 등을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 커플링제는 -COOH 작용기와 -NH₂ 작용기가 아미드 결합(-CONH-)을 형성하는 역할을 하며, 상기 베이스와 보조제는 커플링제가 아미드 결합을 형성할 때 효율을 높일 수 있도록 도와주는 역할을 한다.

[0056] 다음으로, 기질에 아미드 결합으로 부착된 CNT와 이중 아미노 작용기를 가진 디아민계 유기화합물을 반응시키고, 카르복실기가 노출된 CNT를 상기 디아민계 유기화합물의 다른 한 쪽 아미노기와 반응시킨다.

[0057] 본 발명에 있어서, 디아민계 유기화합물로는 HN₂-R₁-NH₂의 화학식을 가지는 물질을 사용할 수 있다. 여기서, R₁은 C₁₋₂₀인 포화탄화수소류, 불포화탄화수소류 또는 방향족 유기기이다.

[0058] 그 다음으로, 카르복실기가 노출된 CNT와 디아민계 유기화합물과의 화학반응을 반복적으로 수행하여 CNT 층과 유기아민 층이 *n*회 교호되게 적층하여 카르복실기가 노출된 고폭도 CNT 패턴을 형성한다.

[0059] 상기 카르복실기가 노출된 CNT 패턴은 상기 카르복실기와 반응하는 화학적 작용기(아미노기, 수산기 등)와 목적 바이오 리셉터가 가지고 있는 작용기와 결합하는 화학적 작용기(아미노기, 수산기, 티올기, 알데히드기 등)를 동시에 가지는 화학물질을 사용하여 개질할 수 있다. 상기 개질에 사용할 수 있는 화학물질로는

$\text{HN}_2\text{-R}_1\text{-NH}_2$, $\text{NN}_2\text{-R}_2\text{-SH}$, $\text{HN}_2\text{-R}_3\text{-OH}$, $\text{HN}_2\text{-R}_4\text{-CHO}$ 등을 사용할 수 있다. 여기서, R_1 , R_2 , R_3 및 R_4 는 독립적으로 C_{1-20} 인 포화탄화수소류, 불포화탄화수소류 또는 방향족 유기기이다.

[0060] 실시예 4: CNT-DNA 칩의 제작

[0061] 본 실시예에서는 카르복실기가 노출된 CNT 패턴에 DNA를 화학적으로 결합시켜 DNA 칩을 제작하였다. 실시예 2에서 제작된 카르복실기가 노출된 CNT 패턴에 DNA의 아미노기를 부착하여 DNA 칩을 제작하였다 (도 1). 다른 방법으로, 실시예 2에서 제작된 카르복실기가 노출된 CNT 패턴에 양쪽에 아미노 작용기를 가진 디아민계 유기화합물로 개질하여 아미노 작용기를 노출시킨 다음, 상기 아미노기에 DNA의 카르복실기를 부착하여 DNA 칩을 제작하였다 (도 2). 본 실시예에서는 말단에 아미노기 또는 카르복실기를 가지는 하기 서열 1의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 CNT-DNA칩을 제작하였다.

[0062] 서열 1 : 5'-TGT GCC ACC TAC AAG CTG TG (C3)-3'

[0063] CNT 패턴상에 DNA의 존재 여부는, 모든 DNA가 인산기(phosphate group)를 함유하고 있는 점을 이용하여 인(phosphorus) 원자에 대한 XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) 스펙트럼을 통해서 확인하였다 (도 3). 도 3에서 보듯이, XPS 표면 분석에서 인이 검출되었으며, 이로부터 CNT 표면에 DNA가 결합되어 있음을 확인할 수 있었다.

[0064] **실시예 5: CNT-DNA 칩을 이용한 혼성화 반응 분석**

[0065] 실시예 3에서 준비된 DNA 칩을 혼성화 챔버(hybridization chamber) 안에 놓은 다음, CNT가 고정된 부위에 혼성화 용액을 피펫으로 떨어뜨리고 그 위를 커버슬라이드로 덮었다. 이 때 혼성화 용액은 $32\mu\text{l}$ 의 상보적인 염기서열의 올리고뉴클레오티드가 담긴 용액을 넣고, 최종 농도가 3XSSC(0.45M NaCl, 0.045M sodium citrate), 0.3% SDS(sodium dodecyl sulfate)가 되게 만들어, 총 부피가 $40\mu\text{l}$ 가 되게 한다. 여기서 혼성화 용액의 상보적인 올리고뉴클레오티드 염기서열은 말단에 FITC(fluorescein isothiocyanate)가 부착된 하기 서열 2를 사용하였다.

[0066] 서열 2: 5'- CAC AGC TTG TAG GTG GCA CA-3'

[0067] 두 올리고뉴클레오티드 가닥의 비특이적 결합을 제거하기 위하여, 이 용액을 100°C 에서 2분간 방치한 후, 12000rpm으로 2분간 원심분리하였다. 혼성화용 챔버 안에서 혼성화 용액이 건조되는 것을 막기 위해 챔버 양쪽 거의 움푹 패인 곳에 3XSSC(0.45M NaCl, 0.045M sodium citrate)를 $30\mu\text{l}$ 씩 넣었다. 챔버 뚜껑을 닫고 55°C 항온조에 10시간 방치하였다.

[0068] 10시간 후, 혼성화 챔버를 항온조에서 꺼내어 2XSSC 용액에 2분 동안 담근 다음, 0.1XSSC(0.015M NaCl, 0.0015M sodium citrate) 및 0.1% SDS 용액에 5분 동안 담근 후, 마지막으로 0.1XSSC에 5분 동안 담가 두었다. DNA 칩 위의 남은 용액을 제거하기 위하여, 칩을 원심분리기 안에 넣고 600rpm으로 5분간

원심분리하였다.

[0069]

혼성화 반응은 서열 2의 올리고뉴클레오티드 말단에 레이블링되어 있는 FITC를 이용하여 형광을 검출하였다. 형광 이미지는 스캔어레이 5000(ScanArray 5000 Packard BioScience, BioChip Technologies LLC) 공초점 미세현미경과 쉐프어레이 마이크로어레이 분석 프로그램(QuantArray Microarray Analysis Software)을 이용하여 얻었다 (도 4). 도 4(a)는 DNA를 결합시키기 전의 카르복실기가 노출된 CNT가 고밀도로 고정된 기질(substrate) 모습을, (b)는 상기 CNT 패턴 상에 아미노기 말단을 가진 DNA를 결합시킨 후 상보적인 DNA를 혼성화 반응 시킨 경우의 형광 검출결과를, (c)는 상보적이지 않은 DNA를 혼성화 반응 시킨 경우의 형광 검출결과를 나타낸 것이다. CNT 패턴에 결합된 올리고뉴클레오티드에 상보적인 염기서열을 가진 올리고뉴클레오티드를 혼성화 반응시켰을 때의 형광이 선명하고 고르게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(b). 그러나, 올리고뉴클레오티드가 고정되어 있지 않은 CNT 패턴인 경우와 CNT 패턴에 결합된 올리고뉴클레오티드에 상보적이지 않은 염기서열을 가진 올리고뉴클레오티드를 혼성화시켰을 때는 전혀 형광이 나타나지 않음을 알 수 있었다 ((a) 및 (c)). 이 결과로부터 비특이적 반응이 거의 일어나지 않음을 확인할 수 있었다.

[0070]

실시예 6

[0071]

도 2에서와 같이 아미노기로 개질된 CNT에 카르복실 말단 작용기를 가진 DNA 사슬(서열 1)을 화학적으로 결합하여 DNA 칩을 제작하고, 실시예 4와 동일한 혼성화 반

응을 수행하였다 (도 5). 도 5에서 (a)는 상보적인 DNA를 결합시킨 경우의 형광 검출결과이고, (b)는 상보적이지 않은 DNA를 결합시킨 경우의 형광 검출결과이다. 상보적이지 않은 염기서열을 지닌 올리고뉴클레오티드와 상보적인 염기서열을 지닌 올리고뉴클레오티드를 같이 혼성화시킨 결과, 혼성화된 것과 되지 않은 것을 확연하게 구분할 수 있었다.

【발명의 효과】

[0072] 이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명은 기질 상의 원하는 위치에 카르복실기가 노출된 CNT를 적층하여 얻어지는 고밀도의 CNT 패턴에 바이오 리셉터를 화학적으로 결합시킨 바이오센서를 제공하는 효과가 있다.

[0073] 본 발명에 따르면, 카르복실기가 노출된 CNT 패턴 또는 상기 카르복실기를 다양한 화학적 작용기로 개질한 CNT 패턴에 다양한 바이오 리셉터를 화학적 또는 물리화학적으로 결합시킨 CNT-바이오센서의 제작이 가능하다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

기질 상에 고밀도로 고정된, 카르복실기가 노출된 탄소나노튜브(CNT)의 패턴에 상기 카르복실기와 결합하는 화학적 작용기를 가진 바이오 리셉터가 화학적 또는 물리화학적 결합에 의해 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 CNT-바이오센서.

【청구항 2】

기질 상에 고밀도로 고정된, 카르복실기가 노출된 탄소나노튜브(CNT)의 패턴을 상기 카르복실기와 결합하는 작용기와 아미노기, 알데히드기, 수산기, 티올기 및 할로젠으로 구성된 군에서 선택된 화학적 작용기를 동시에 가지는 화학물질로 개질한 다음, 상기 개질에 의해 노출된 아미노기, 알데히드기, 수산기, 티올기 및 할로젠으로 구성된 군에서 선택된 화학적 작용기에, 상기 화학적 작용기와 결합하는 작용기를 가진 바이오 리셉터를 화학적 또는 물리화학적으로 결합시켜 수득되는 것을 특징으로 하는 CNT-바이오센서.

【청구항 3】

제1항 또는 제2항에 있어서, 바이오 리셉터는 효소기질, 리간드, 아미노산, 펩티드, 단백질, 핵산(DNA, RNA), 지질, 코펙터 또는 탄수화물인 것을 특징으로 하는 CNT-바이오센서.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 바이오 리셉터는 단백질 또는 핵산(DNA, RNA)인 것을 특징으로 하는 CNT-바이오센서.

【청구항 5】

제1항 또는 제2항에 있어서, 카르복실기와 결합하는 화학적 작용기는 아미노기 또는 수산기인 것을 특징으로 하는 CNT-바이오센서.

【청구항 6】

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 CNT 패턴은 하기의 단계를 거쳐 제조되는 것임을 특징으로 하는 CNT-바이오센서:

(a) 표면에 아미노기가 노출된 기질과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 상기 아미노기와 상기 카르복실기 간에 아미드 결합을 형성시켜 기질 표면에 CNT 단층을 형성하는 단계;

(b) 상기 CNT 단층과 디아민계 유기화합물을 반응시켜 상기 CNT 단층위에 유기아민 층을 형성시키고, 상기 유기아민과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 CNT를 적층하는 단계; 및

(c) 상기 (b)단계를 n회 반복하여 CNT 층과 유기아민 층이 n회 교호되게 적

층하여 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패턴을 형성하는 단계.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 표면에 아미노 작용기가 노출된 기질은 기질을 아미노알킬 옥시실란으로 처리하여 얻어진 것임을 특징으로 하는 CNT-바이오센서.

【청구항 8】

제6항에 있어서, 상기 기질 표면에 노출된 아미노기는 원하는 위치에 CNT를 결합시키기 위하여 패턴형태로 노출되어 있는 것을 특징으로 하는 CNT-바이오센서.

【청구항 9】

다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 CNT 패턴에 바이오 리셉터가 결합되어 있는 CNT-바이오센서의 제조방법 :

(a) 표면에 아미노기가 노출된 기질과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 상기 아미노기와 상기 카르복실기 간에 아마이드 결합을 형성시켜 기질 표면에 CNT 단층을 형성하는 단계;

(b) 상기 CNT 단층과 디아민계 유기화합물을 반응시켜 상기 CNT 단층위에 유기아민 층을 형성시키고, 상기 유기아민과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 CNT를 적층하는 단계;

(c) 상기 (b)단계를 n 회 반복하여 CNT 층과 유기아민 층이 n 회 교호되게 적층하여 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패턴을 형성하는 단계; 및

(d) 상기 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패턴에 상기 카르복실기와 결합하는 화학적 작용기를 가진 바이오 리셉터를 화학적 또는 물리화학적으로 결합시키는 단계.

【청구항 10】

다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 CNT 패턴에 바이오 리셉터가 결합되어 있는 CNT-바이오센서의 제조방법 :

(a) 표면에 아미노기가 노출된 기질과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 상기 아미노기와 상기 카르복실기 간에 아미드 결합을 형성시켜 기질 표면에 CNT 단층을 형성하는 단계;

(b) 상기 CNT 단층과 디아민계 유기화합물을 반응시켜 상기 CNT 단층위에 유기아민 층을 형성시키고, 상기 유기아민과 카르복실기가 노출된 CNT를 반응시켜 CNT를 적층하는 단계;

(c) 상기 (b)단계를 n 회 반복하여 CNT 층과 유기아민 층이 n 회 교호되게 적층하여 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패턴을 형성하는 단계;

(d) 상기 카르복실기가 노출된 고밀도 CNT 패턴을 상기 카르복실기와 결합하는 작용기와 아미노기, 알데히드기, 수산기, 티올기 및 할로젠으로 구성된 군에서

선택된 화학적 작용기를 동시에 가지는 화합물질로 개질하는 단계; 및

(e) 상기 개질에 의해 노출된 아미노기, 알데히드기, 수산기, 티올기 및 할로겐으로 구성된 군에서 선택된 화학적 작용기에 상기 화학적 작용기와 결합하는 작용기를 가진 바이오 리셉터를 화학적 또는 물리화학적으로 결합하는 단계.

【청구항 11】

제9항 또는 제10항에 있어서, 표면에 아미노 작용기가 노출된 기질은 기질을 아미노알킬옥시실란으로 처리하여 얻어진 것임을 특징으로 하는 방법.

【청구항 12】

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 기질 표면에 노출된 아미노기는 원하는 위치에 CNT를 결합시키기 위하여 패턴형태로 노출되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 13】

제12항에 있어서, 상기 아미노기의 패턴은 아미노기가 노출된 기질에 포토레지스트 또는 유기초분자 패턴을 형성하여 얻어지는 것임을 특징으로 하는 방법.

【청구항 14】

제12항에 있어서, 상기 아미노기의 패턴은 기질 상에 포토레지스트 또는 유기초분자 패턴을 형성한 다음, 아미노알킬옥시실란으로 처리하여 얻어진 것임을 특징으로 하는 방법.

【청구항 15】

제9항 또는 제10항에 있어서, 카르복실기와 결합하는 화학적 작용기는 아미노기 또는 수산기인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 16】

제9항 또는 제10항에 있어서, 바이오 리셉터는 효소기질, 리간드, 아미노산, 펩티드, 단백질, 핵산(DNA, RNA), 지질, 코팩터 또는 탄수화물인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 17】

제1항 또는 제2항의 CNT-바이오센서를 이용하는 것을 특징으로 하는 바이오 리셉터와 결합하거나 반응하는 표적 바이오물질의 검출방법.

【청구항 18】

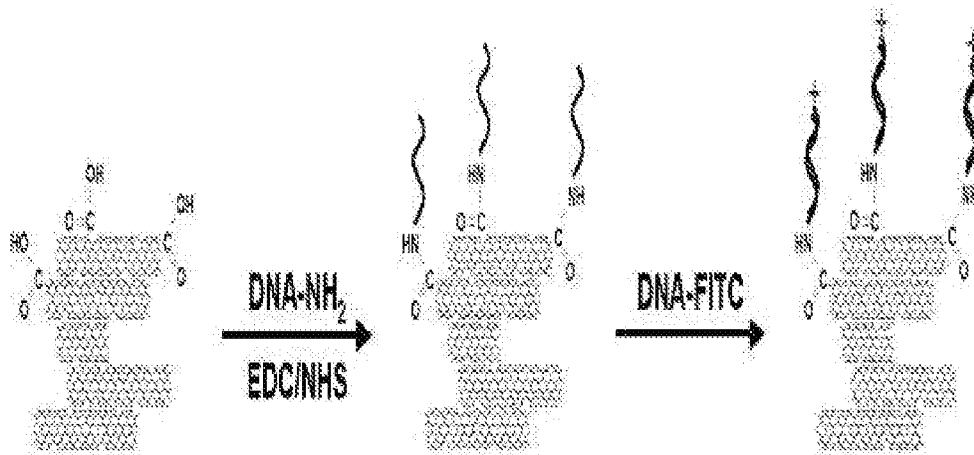
제1항 또는 제2항에 있어서, 바이오 리셉터는 DNA인 것을 특징으로 하는 CNT-DNA칩.

【청구항 19】

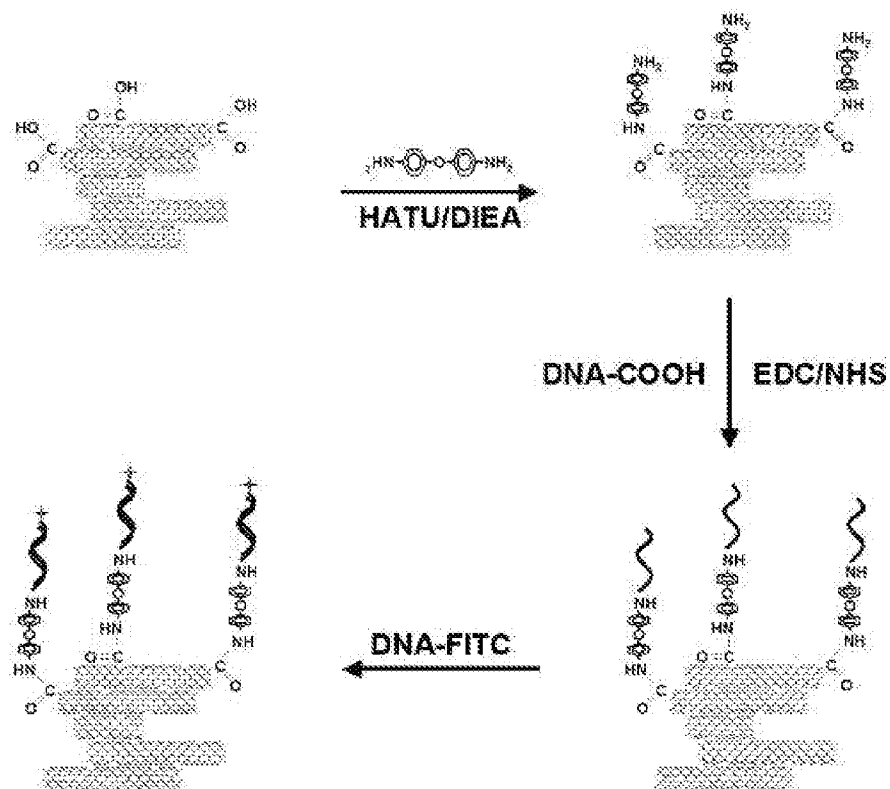
제18항의 CNT-DNA칩을 이용하는 것을 특징으로 하는 DNA 혼성화 반응의 검출 방법.

【도면】

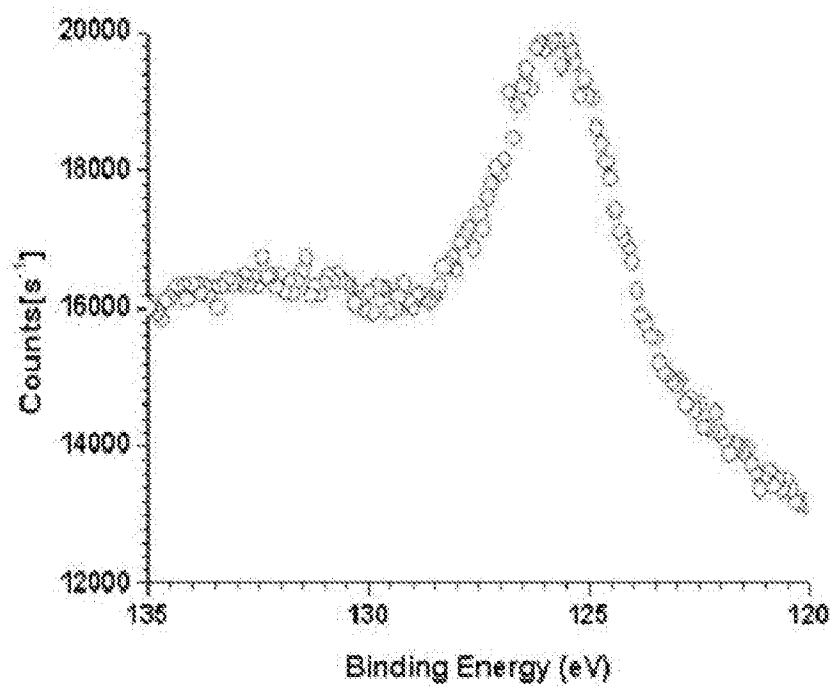
【도 1】



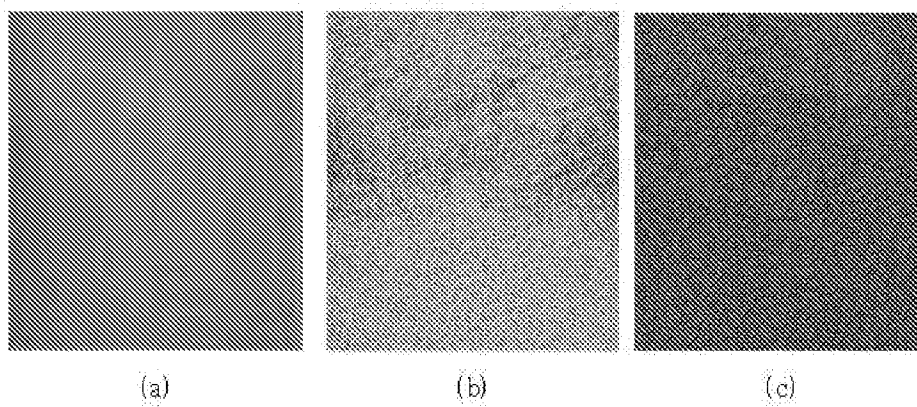
【도 2】



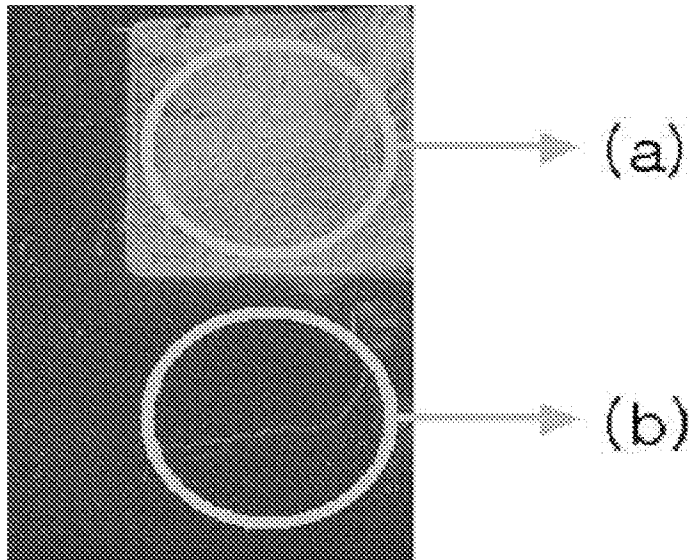
【도 3】



【도 4】



【도 5】



【서열목록】

<110> KAIST
<120> Method for Manufacturing a Biosensor Using the High Density
Carbon Nanotube Pattern
<160> 2
<170> KopatentIn 1.71
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> oligonucleotide for DNA-chip
<400> 1
tgtgccacct acaagctgtg
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

20

<223> oligonucleotide for DNA-chip

<400> 2

cacagcttgt aggtggcaca

20